

Har intraartikulär stamcellsbehandling en klinisk effekt, med avseende på hältan, hos hundar med osteoartrit?

Rebekka Eugénie Bakke

Uppsala

2018



*Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp
Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen
Delnummer i serien: 2018:12*

Har intraartikulär stamcellsbehandling en klinisk effekt, med avseende på hältan, hos hundar med osteoartrit?

Have intra-articular stem cell treatments any clinical efficacy on lameness in dogs with osteoarthritis?

Rebekka Eugénie Bakke

Handledare: Eva Skiöldebrand, Sektionen för patologi,
Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap, SLU

Examinator: Maria Löfgren, Sektionen för patologi,
Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap, SLU

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2018

Omslagsbild: Creative Commons Zero (CC0) licensed

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serien: 2018:12

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: osteoartrit, mesenkymala stamceller, stamcellsbehandling, intraartikulär injektion, hund, hälta

Key words: osteoarthritis, mesenchymal stem cells, stem cell therapy, intraarticular injection, dog, canine, lameness

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt.....	4
Synovialledens uppbyggnad.....	4
<i>Ledkapsel</i>	4
<i>Ledbrosk</i>	5
<i>Subkondrala benet</i>	7
<i>Senor och ligament</i>	7
Osteoartrit.....	7
<i>Etiologi</i>	7
<i>Patogenes</i>	7
Mesenkymala stamceller	10
<i>Potentialen med MSC</i>	10
<i>Utvinning, differentiering och adherering</i>	10
<i>Antiinflammatoriska egenskaper</i>	11
Studier med MSC	11
<i>Experimentella och kliniska försök</i>	11
Diskussion	16
Konklusion	18
Ordlista.....	18
Litteraturförteckning	19

SAMMANFATTNING

Stamcellsbehandling av hundar med osteoartrit är idag en högst aktuell cellterapi metod inom veterinärmedicinen. Osteoartrit, tidigare benämnd som artros, är en lågradig samt kronisk inflammatorisk ledsjukdom som drabbar över 20 % av den vuxna hundpopulationen. Denna vanliga sjukdom orsakar multifaktoriella skador som drabbar hela leden som organ. Syftet med detta arbete är att svara på frågan huruvida intraartikulär stamcellsbehandling har en klinisk effekt, med avseende på hältan, hos hundar med osteoartrit.

En frisk synovialled fördelar krafterna som uppkommer vid belastning och möjliggör friktionsfria rörelser vid fysisk aktivitet. Anatomiskt består leden av ledkapsel, ledbrosk, subkondralt ben, samt stabiliserande senor och ligament, som tillsammans utgör hela organet. Det hyalina brosket i leden skyddar benvävnadens epifys mot belastning och består histologisk av kondrocyter och extracellulärt matrix. Broskmatrixen byggs i sin tur upp av ett nätverk av kollagenfibrer, proteoglykaner och en rad andra molekyler. Proteoglykanerna, som syntetiseras av kondrocyter, binder till ett kärnprotein som formar glukosaminoglykaner. Dessa är hydrofila och har därför en hög vattenhållande förmåga, vilket är viktigt för att upprätthålla broskets elasticitet. Kollagenmolekylerna ger brosket dess draghållfasthet.

De kliniska symptomen vid osteoartrit är främst hälta följt av inflammation och smärta i leden som leder till avtagande fysisk aktivitet. Mikroskopisk ses en kronisk inflammation, fibrillering av broskytan, broskförlust, fissurer, clusters, bildning av osteofyter och subkondral benskleros i synovialleden, vilket medför smärta och en försämrad livskvalité för hundarna som drabbas av sjukdomen. Oftast orsakas en primär broskskada av överträning, infektioner eller onormala ledkonformationer vilket ger upphov till onormal stress på leden. Detta predisponerar i sin tur för utvecklingen av osteoartrit.

Behovet av en behandlingsmetod som fokuserar på ledens egna uppbyggande förmåga är stort, då dagens behandlingar av osteoartrit främst är inriktat på smärtlindring.

Stamcellsbehandlingar är därför en intressant biologisk behandlingsmetod, eftersom de mesenkymala stamcellerna potentiellt innehar förmågan att differentiera till nya kondrocyter som kan producera ett nytt funktionellt broskmatrix.

Hittills har ett begränsat antal kliniska studier gjorts kring behandlingar med stamceller hos hundar med osteoartrit. Stamcellsbehandlingar har i flera studier, som behandlats i detta arbete, visat på en klinisk effekt som avtagande hälta liksom minskad inflammation efter de intraartikulära injektionerna. Undersökningarna har dock för det mesta omfattat ett fåtal individer, genomförts med behandlingsmetoder som ej är jämförbara och ibland gjorts i frånvaro av kontrollgrupper. Det är nödvändigt att flera mer detaljerade och omfattande studier görs på hund för att enklare kunna bedöma och dra en slutsats om stamcellernas kliniska effekt på leden.

SUMMARY

Today, stem cell treatment has become a highly modern biological therapy within the veterinary medicine. Osteoarthritis, traditionally called arthrosis, is a low-graded chronic inflammatory joint disease affecting about 20 % of the adult population of dogs. This frequently occurring disease causes multifactorial damages in the joint as an organ. The aim of this literature study is to clarify whether intra-articular stem cell therapy, as a treatment of canine osteoarthritis, has a clinical efficacy on lameness in dogs.

A healthy synovial joint can distribute the forces that occur when the joint is exposed to pressure and facilitate frictionless movement during physical activity. Anatomically, the joint consists of a joint capsule, joint cartilage, subchondral bone, and stabilizing tendons and ligaments. The joint's hyaline cartilage protects the bone of the epiphysis from mechanical stress and consists histologically of chondrocytes and extracellular matrix. Further, the cartilaginous matrix is built up of a network of collagen fibres, proteoglycans and a collection of other compounds. The proteoglycans, produced by the chondrocytes, connect to a core protein which shapes the structure of glucosaminoglycans. These are hydrophilic, contributing to their water-holding capacity, which is important for maintaining the elasticity. The tensile strength of the joint is given by the collagens.

The clinical symptoms of osteoarthritis are mainly lameness, followed by inflammation and pain contributing to a decrease in physical activity, but microscopical findings reveal further injuries, such as a chronic inflammation, fibrillation of the joint surface, cartilaginous loss, fissures, clusters, osteophytes and subchondral bone-sclerosis of the synovial joint. This entails pain suffering and a decreased quality of life for the affected dogs. Regularly, the predisposed factors for the development of osteoarthritis are overtraining, infections or irregular joint congruences or conformations, which may lead to abnormal stress on the joint.

Treatments of osteoarthritis currently in use do not focus on the regenerative capacity of the cartilage, but rather on a variety of pain relieve methods. Stem cell therapy is therefore a highly interesting biological treatment, as the mesenchymal stem cells have the potential to differentiate into new chondrocytes with the capacity of rebuilding the cartilage compounds of the matrix.

Up to present time, only a limited quantity of clinical studies about stem cell therapy on dogs with osteoarthritis have been done. Stem cell treatments have in several studies, as presented in this work, showed a clinical effect through decreased lameness as well as reduced inflammations after the intra-articular injection. On the other hand, most research studies have been either small-scaled or in absence of control groups, and may not be comparable due to differences in the method of the treatments. Further research within the stem cell field, with more detailed and extensive studies, is necessary if we are to be able to draw supplementary conclusions about the stem cell treatment's clinical effect on the synovial joint.

INLEDNING

Osteoartrit (OA), som i dagligt tal även kallas artros, är en mycket vanlig låggradig inflammatorisk ledsjukdom som drabbar mer än 20% av hundarna över 1 års ålder (Johnston, 1997). Sjukdomen karaktäriseras av en kronisk inflammation, broskförlust och benpålagringar i synovialleder. Skadorna som uppstår är multifaktoriella, drabbar alla strukturer i leden och kan ge upphov till kronisk smärta som medför en sänkt livskvalité för de hundar som inte får behandling (Man & Mologhianu, 2014; Robinson *et al.*, 2016).

Idag finns inga effektiva behandlingsmetoder som kan återuppbygga brosket samt verka inflammationsdämpande och därmed hämma progressionen av OA. Mesenkymala stamceller (MSCs) finns naturligt i ledvätskan, men vid ökande ålder försämras cellernas regenerativa förmåga. Genom att injicera autogent eller allogent MSCs i leder med OA är förhoppningen att cellerna, med rätt stimulering, ska kunna differentiera ut till nya kondrocyter som kan producera de broskkomponenter som behövs i ledbrosket. Det kliniska intresset för stamcellsbehandlingar ökar ständigt inom veterinärmedicinen på grund av deras regenerativa förmåga (Yun *et al.*, 2016).

Behandling av OA med MSCs är således ett högaktuellt ämne och därför syftar denna litteraturstudie till att besvara frågeställningen om intraartikulära stamcellsbehandlingar har en klinisk effekt, med avseende på hältan, hos hundar med OA.

MATERIAL OCH METODER

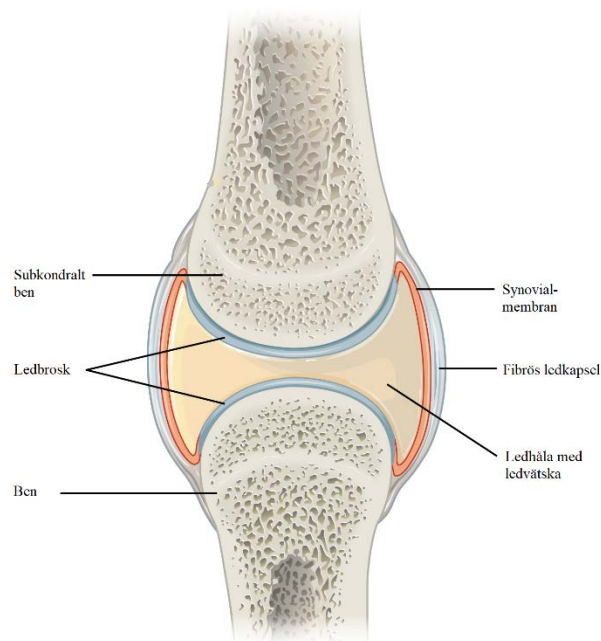
Databaserna PubMed, Web of Science och Scopus tillämpades vid litteratursökningen. Sökorden (osteoarthritis OR OA) AND (canine OR dog*) AND (MSC* OR mesenchym* OR stem cell OR cell therapy) användes, men i en sökning uteslöts sökordet (canine OR dog) för att även identifiera studier utan hund som modelldjur.

Böckerna *Physiology of domestic animals* samt *Pathologic basis of veterinary disease* har använts för insamling av grundläggande fakta kring ledens anatomi och sjukdomen osteoartrit. För att förtydliga ofta förekommande termer, finns en ordlista tillagd innan litteraturförteckningen.

LITTERATURÖVERSIKT

Synovialledens uppbyggnad

Leder kan delas in i synovialleder, fibrösa leder och kartilaginösa leder (Sjaastad *et al.*, 2010). Synovialleder, även kända som kroppens äkta leder, möjliggör stora och friktionsfria rörelser. Detta arbete kommer fokusera på synovialleder som är hundens vanligaste led, samt den led där problem med osteoartrit oftast förekommer (Johnston, 1997). Leden räknas som ett organ uppbyggd av ledkapseln, ledbrosket, subkondrala benet, senor och ligament (Se *Figur 1*) (Robinson *et al.*, 2016).



Figur 1: Synovialledens uppbyggnad. Modifierad bild från OpenStax College.

Ledkapsel

De ben som ingår i en synovialled omges av en ledkapsel som skyddar benens ledytor. Kapseln består av ett synovialmembran innerst, subsynovialt lager i mitten och ett fibröst lager ytterst. Synovialmembranet består av typ A och typ B-synoviocyter. Typ A-synoviocyter fagocyterar avfallsämnen från leden, medan typ B-synoviocyterna producerar hyaluron till ledvätskan och även nedbrytande enzymer. Det yttersta fibrösa lagret bidrar till ledens fysiska stabilitet (Johnston, 1997).

Ledvätska

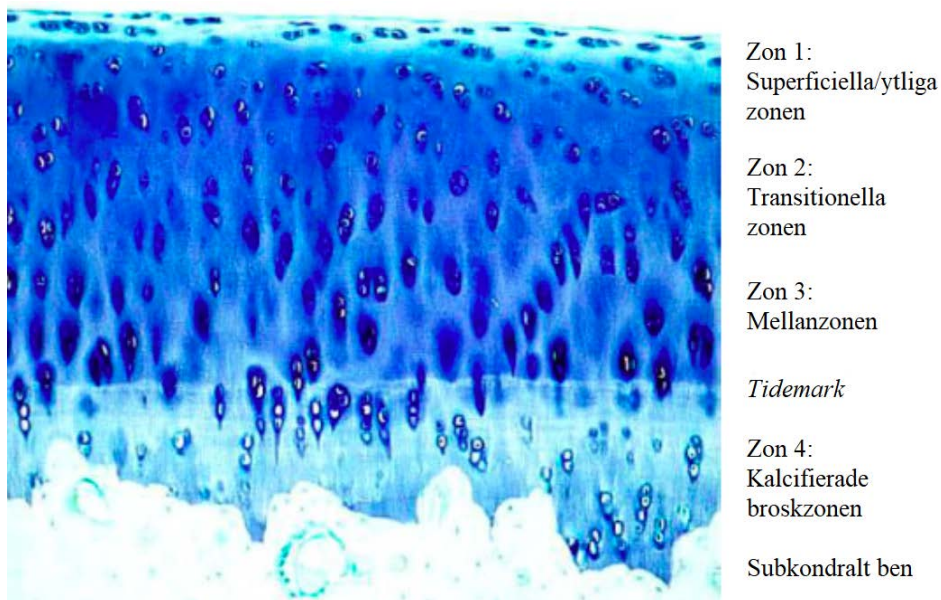
Mellan ledytorna finns en ledhåla som innehåller ledvätska (synovialvätska). Synovialvätskan, som utsöndras från synovialmembranet, smörjer leden samt förser kondrocyterna med näring (Sjaastad *et al.*, 2010).

Ledbrosk

Ett lager av hyalint brosk skyddar benvävnadens epifys mot belastning, och möjliggör vidareföring av mekaniska krafter till det subkondrala benet (Johnston, 1997). Ledbrosket har ingen nerv-, lymf- eller blodförsörjning och tål mycket påfrestning utan att smärta eller blödningar uppstår (Sjaastad *et al.*, 2010).

Kondrocyter

Ledbrosket består av endast en celltyp, kondrocyter, som upptar ca 5% av vävnadsvolymen, och extracellulära matrixet (ECM) (Buckwalter *et al.*, 2005; Johnston, 1997). Kondrocyterna är metaboliskt aktiva celler som producerar byggstenar till ECM. Dessa omsluts av en pericellulär kapsel som tillsammans med pericellulära matrixet bildar kondroner som reglerar miljön kring kondrocyterna. Cellerna i kondronet har cell-cell kontakter, liksom cellerna i det superficiella lagret. Övriga kondrocyter har inte cell-cell kontakter och kommunicerar via det pericellulära matrixet (Johnston, 1997).

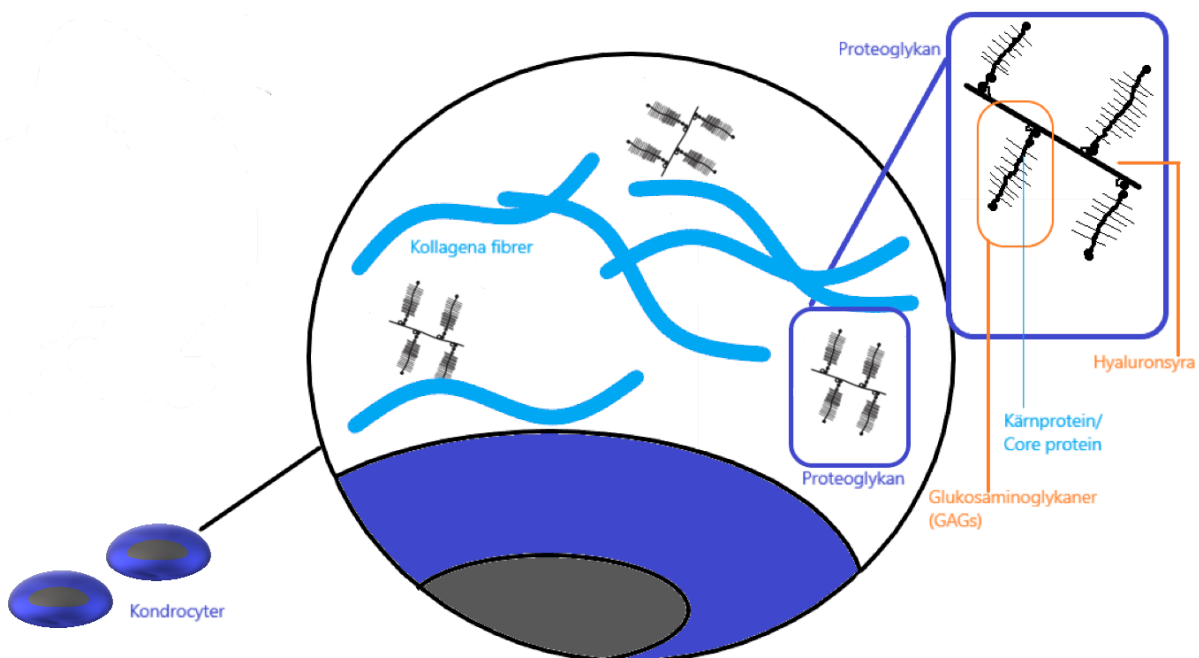


Figur 2: Ledbroskets zoner. Modifierad bild från Eva Skiöldebrand, 2004.

Ledbrosket är indelat i olika zoner beroende på fördelningen av kondrocyter, kollagena fibrer och proteoglykaner (Se Figur 2). I zon 1, den superficiella zonen som ligger närmast ledytan, finns en låg halt proteoglykaner och de kollagena fibrerna är organiserade tangentiellt från ledytan (Johnston, 1997; Buckwalter *et al.*, 2005). I detta området finns även vilande kondrocyter med mesenkymala stamcellsegenskaper. Kondrocyterna i zon 1 har en plattare form än cellerna i de djupare lagren som är mer rundformade (Goldring, 2012). I zon 2, den transitionella zonen, finns ett större antal kondrocyter och proteoglykaner jämfört med zon 1. Kondrocytdensiteten ökar sedan i zon 3, mellan-zonen, och cellerna börjar arrangeras i vertikala kolumner, samtidigt som kollagennätverket börjar förlora sin parallella struktur med ledytan, och bli mer oregelbundet. Till sist i zon 4, den kalcifierade broskzonen, finns kalcifierade kondrocyter, en del kollagen, men nästan obefintligt med proteoglykaner. Ledbrosket vid zon 4 och den underliggande benvävnaden separeras från zon 3 med en cementlinje, osteokondrala junction, även kallad *tide mark* (Johnston, 1997; Buckwalter *et al.*, 2005).

Extracellulära matrix

Det extracellulära matrixet består av vatten, kollagen och proteoglykaner (Se *Figur 3*). Kollagenfibrerna bidrar till broskmatrixets fasta struktur, och är uppbyggda av proteinmonomerer som består av tre polypeptid-alfakedjor som bildar en trippelhelix. Kollagen typ II är det vanligaste kollagenet i ledbrösket. En proteoglykan består av ett kärnprotein dit flera olika glukosaminoglykaner (GAGs) fäster. Kondroitinsulfat, keratansulfat och dermatansulfat är de mest förekommande glukosaminoglykanerna som binder till proteoglykanernas kärnprotein. GAGs är negativt laddade vilket gör att kedjorna repellerar varandra och hålls separerade, vilket innebär att molekylen upptar ett stort område i brosket. Proteoglykaner är hydrofila, och kan bidra till en vattenhållande förmåga och ett högre tryck i brosket vilket är viktigt för att behålla elasticiteten. Proteoglykaner delas in i två grupper beroende på monomerens förmåga att aggregera med hyaluron. Hyaluron finns i ECM och bildar kedjor med proteoglykaner men är också en viktig molekyl i ledvätskan. De extracellulära matrix proteinerna syntetiseras av kondrocyterna (Johnston, 1997).



Figur 3: Komponenter i extracellulära matrix (ECM). Modifierad bild från Li Gessbo, 2004.

Hur kollagenfibrerna är organiserade i brosket har betydelse för broskets stabilitet och stötdämpningsförmåga. Kollagenfibrerna spelar en viktig roll i broskets superficiella zon där proteoglykanmängden är som lägst. Detta lager fungerar som ett membran som kan motstå vätsketrycket som uppstår längre ner i brosket där mer proteoglykaner förekommer. Tack vare proteoglykanernas höga affinitet för vatten bibehålls broskets svulstighet, vilket motverkar broskdeformationer när leden utsätts för hög belastning. Att brosket kan motstå kompressioner beror till en stor del på kollagen och proteoglykanernas struktur och organisation i brosket, samt vattnets långsamma rörelse i broskmatrixet. I några studier har det visats att ledbrösket kan anpassa sig den belastning den utsätts för genom att hårdare och mer kompakt brosk bildas på områden i leden med högst mekanisk stress (Johnston, 1997).

Subkondrala benet

Det subkondrala benet består av en subkondral benplatta, som ligger under ledbrösket, och därefter kommer det trabekulära benet, samt benmärgen. Subkondrala benet separeras från ledbrösket med ett kalcifierat brosklager (Man & Mologhianu, 2014).

Senor och ligament

Lederna stabiliseras av starka fibrösa ligament av bindväv. Ligamenten begränsar ledens rörelser och förhindrar överextension eller överflexion av leden (Sjaastad *et al.* 2010). Meniskerna stabiliserar leden genom att fästa vid ledkapseln eller ligament beroende på typ av synovialled (Johnston, 1997).

Osteoartrit

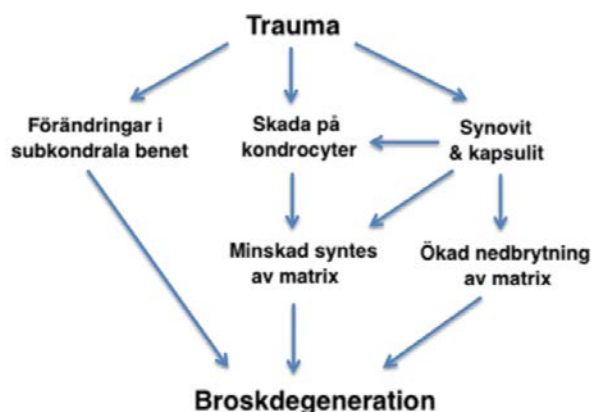
Etiologi

Osteoartrit (OA) är en mycket vanlig kronisk låggradig inflammatorisk ledsjukdom där broskförlust, skleros, ledinflammation och fibros, orsakar kliniska symptom som smärta och håla hos både unga och äldre hundar, vilket bidrar till minskad fysisk aktivitet hos djuren (Robinson *et al.*, 2016; Zachary, 2017). OA anses idag att vara en multifaktoriell sjukdom som drabbar hela leden med en komplex interaktion mellan olika ledvävnader (Man & Mologhianu, 2014).

Det finns två former av OA, primär och sekundär. När inget trauma eller belastningsskada har gett upphov till OA kallas sjukdomen för primär OA. Denna är ofta polyartikulär och anses ovanlig hos hundar men förekommer hos ett fåtal hundraser. Sekundär OA, den mest förekommande varianten, uppkommer när ett oskadat brosk utsatts för onormal stress. Infektioner i leden, överträning, traumatisk broskskada, osteokondros, immunmedierade inflammationer, luxationer och onormala ledkonformationer kan vara predisponerande faktorer till sekundär OA (Vaughan-Scott & Taylor, 1997).

Patogenes

Under lång tid har OA beskrivits som en degenerativ ledsjukdom, men på senare år har det visats att den låggradiga inflammationen som bildas i leden är en viktig faktor till patogenesen (Se *Figur 4*). OA innefattar inte enbart nedbrytning av brosk utan även synovit, hypertrofi av både brosk och ledkapsel, remodelering av subkondrala benet och bildning av osteofyter (Se *Figur 5*) (Robinson *et al.*, 2016).



Figur 4: Broskdegeneration vid osteoartrit. Modifierad bild från Kidd, 2001.

OA:s påverkan på ledbrosket

I ett tidigt degraderingsstadium av OA sker en fokal förlust av ledbroskets yttre lager, samtidigt som att ytligaste kollagena fibrerna slits. Vid utbredningen av OA har det visats att kondrocyternas fenotyp modifieras till att bli hypertrofa, makrofagliknande eller apoptotiska. Detta bidrar till broskhypertrofi, brosknedbrytning och mineraliseringar av brosket. Överproduktion av aggrecan, broskets vanligaste proteoglykan, och kollagen typ II kan ses initialt. Detta åtföljs senare av en minskad produktion av matrixmolekyler, samt en ökad nedbrytning av molekyler i matrix. Då cellen hypertrofierar bildas versican (en stor matrix-proteoglykan) och kollagen typ I samt kollagen typ IIA, III och X som normalt inte förekommer, men som är karakteristiskt för ett hypertrofiskt brosk. Dessa komponenter bidrar till en ökad vätskehållande förmåga i brosket. En ökad proteolytisk aktivitet, delvis beroende av en ökad produktion av metalloproteinaser (MMPs), är huvudanledningen till nedbrytningen av aggrecan och typ II kollagen i brosket. Förlust av kondrocyter kan bero på en defekt cellreparation (Henrotin *et al.*, 2005).

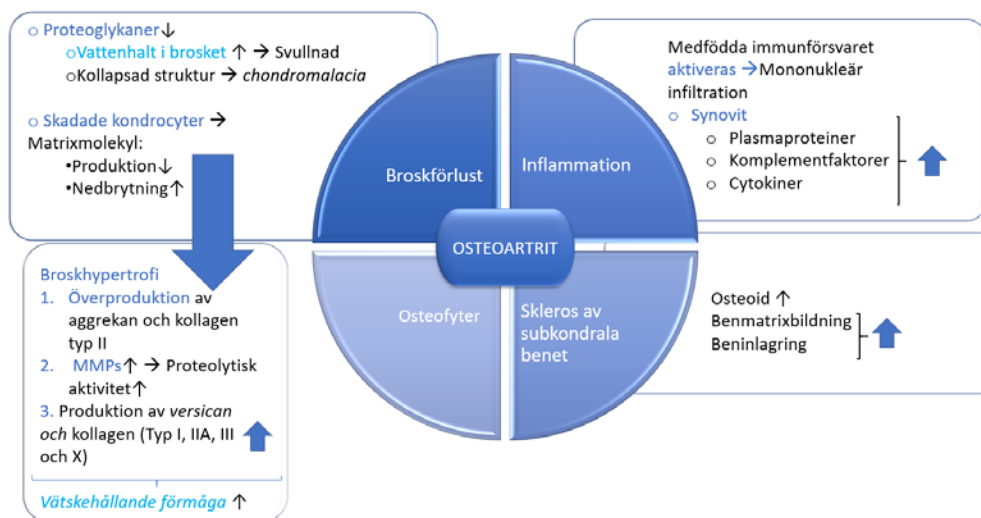
Förändringarna i brosket börjar initialt med förlust av proteoglykaner som ofta ses i samband med en ökad vattenhalt i broskmatrixen och en svullnad i ledvävnaden. Det är inte klarlagt varför proteoglykanernas vattenhållande förmåga minskar, men en möjlig etiologi är att osteoartrit medför en förändrad transport och metabolism av näringsämnen och avfallsprodukter från kondrocyterna (Zachary, 2017), eller att cytokinfrisättningen som följd av att kondrocyterna skadas påverkar proteoglykansyntesen (Vaughan-Scott & Taylor, 1997).

I en frisk led håller proteoglykanerna kollagenfibrerna åtskilda från varandra, men i en led som drabbas av OA medför istället den minskande mängden proteoglykaner att kollagenstrukturen kollapsar. Detta leder till att brosket blir för mjukt (*chondromalacia*) och möjliggör nedbrytning av det ytliga ledbrosket vid onormal belastning av leden. Om sjukdomen förvärras blir erosionerna djupare och kan orsaka ulcerationer genom ledbrosket, och ned genom det kalcifierade lagret till det subkondrala benet (Zachary, 2017).

Förekomst av osteofyter är vanligt hos OA-patienter. Osteofyter består av en central benkärna sammankopplad med det subkondrala benet och uppkommer ofta vid övergången mellan

synovium, perikondrium och periostet. Etiologin bakom osteofyternas bildning är okänd, men synoviala makrofager verkar spela en stor roll vid bildningen av osteofyter (Johnston, 1997; Robinson *et al.*, 2016).

Det är fortfarande oklart huruvida skleros i subkondrala benet är orsaken till brosklesionerna i OA eller enbart en konsekvens av skadorna. Vid OA förtjockas subkondrala benet genom en ökning av osteoid och en låg mineralisering. Osteoblasterna visar på en ändrad fenotyp. Obalansen initierar därmed en ökad benmatrixbildning och beninlagring, som medför ett stummare ben (Henrotin *et al.*, 2005).



Figur 5: Översikt över patogenesen vid osteoartrit. Egen bild, 2018.

Inflammation

Inflammationen vid OA skiljer sig från autoimmuna sjukdomar genom att den är kronisk, låggradig och främst medierad via det medfödda immunförsvaret. Vid OA har ledvävnaden onormalt höga nivåer av plasmaproteiner, komplementfaktorer och cytokiner som ledens olika celler producerar (Robinson *et al.*, 2016).

I ett tidigt stadiet av OA är synoviter vanligt förekommande, vilket leder till en mononukleär infiltration i ledhålan och ett överuttryck av inflammatoriska mediatorer i synovialmembranet (Robinson *et al.*, 2016). Förhöjda halter av immunoglobulin, komplementfaktorer, inflammatoriska cytokiner, makrofager och T-lymfocyter i ledvätskan, är vanligt förekommande. En kronisk synovit kännetecknas även av villös hypertrofi och hyperplasi. Synovialvätskan blir transparent, färglös och får en lägre viskositet genom att hyaluronsyramolekylen bryts ned i mindre fragment (Henrotin *et al.*, 2005).

Mesenkymala stamceller

Behandlingspotentialen med MSCs

Mesenkymala stamceller (MSCs) finns naturligt i ledvätskan. I samband med att individer åldras, minskar mängden celler och deras förmåga att differentiera till broskceller försämras, vilket är en bidragande faktor till OA. Att använda MSCs som behandling av osteoartrit är av stort intresse eftersom de flesta behandlingar i dag främst fokuserar på smärtlindring. Behovet av att utveckla en behandlingsmetod som förhindrar ytterligare broskskada, dämpar inflammationen och bygger upp nya broskceller är stort, vilket gör mesenkymala stamceller till en intressant behandling (Yun *et al.*, 2016). Inom dagens veterinärmedicin är stamcellsbehandlingar vanligast vid muskel och skelettlesjoner hos hundar och hästar (Fortier & Travis, 2011). Hundar anses vara bättre modelldjur för humana stamcellsbehandlingar än gnagare på grund av anatomiska och fysiologiska likheter, och därför har en del experimentella och prekliniska studier gjorts på hund (Bakker *et al.*, 2013).

Utvinning, differentiering och adherering

Stamceller kan differentiera till specialiserade celler i ett organ, och delas in i adulta eller embryonala stamceller. Adulta stamceller, som används vid behandling av OA, kan utvinnas från endo-, meso- eller ektoderma vävnader, där benmärgs (BM-MSCs)- och fettvävnadsderiverade MSCs (AD-MSCs) hittills är vanligast inom experimentella och kliniska studier (Bakker *et al.*, 2013). Vid kliniska studier används främst autologa eller allogena AD-MSCs, framför BM-MSCs som mer frekvent används i experimentella studier. Autologa celler tas från patientens egna vävnader, isoleras i cellkultur och därefter injiceras i samma patient igen (Guercio *et al.*, 2012). Allogena celler skiljer sig från autologa, eftersom de först isoleras från en annan donator av samma art, innan odling i cellkultur och injicering i mottagaren (Bakker *et al.*, 2013).

MSCs måste uppfylla minst tre kriterier för att kunna definieras som stamceller. De ska kunna växa som adherenta celler i cellkulturer, uttrycka cellyteantigen (CD44, CD90 och CD105) samt sakna endoteliala och hematopoetiska markörer, och kunna differentiera till minst tre olika vävnadsceller exempelvis osteocyter, kondrocyter och adipocyter. Vid behandling av OA är det även önskvärt att de nydifferentierade broskcellerna bildar ett hyalint broskmatrix (Kriston-Pál *et al.*, 2017).

Hos hundar kan BM aspireras från proximala humerus, proximala femur eller tuber coxae. BM-MSCs verkar att lättare kunna differentiera till kondrocyter. Nyligen har även AD-MSCs börjat användas på grund av att fettvävnaden med enkelhet kan tas från olika delar av kroppen, och kan samlas i stora kvantiteter utan att behöva utföra svåra invasiva ingrepp. AD-MSCs är dessutom icke-immunogena och verkar immunsuppressivt (Bakker *et al.*, 2013).

Antiinflammatoriska egenskaper

Behandlingar med MSCs kan, enligt flera tidigare studier, verka immunomodulerande (Cosenza *et al.*, 2017). Det har visats att MSCs kan förhindra aktivering av T-celler. Även MSC-differentierade kondrocyter, adipocyter och osteocyter har påvisats ha antiinflammatoriska egenskaper (Mamidi *et al.*, 2016), vilket medför en minskad lokal infektion (Nicpoń *et al.*, 2014).

Andra studier har visat att inflammationen i leden kan medföra att cytokiner och tillväxtfaktorer stimulerar MSCs-cellerna parakrint (Guercio *et al.*, 2012). Stamcellerna kan därmed frisätta vesiklar (Nicpoń *et al.*, 2014), innehållande immunsuppressiva mediatorer. Dessa kan skydda brosk och benvävnad från degradering, genom att undvika att kondrocyterna går i apoptos och inhibera aktivering av makrofager i leden (Cosenza *et al.*, 2017).

Studier med MSC

Experimentella och kliniska försök

Den första randomiserade och blindade kliniska studien på hund där stamcellsbehandlingen ansågs vara effektiv gjordes 2007 (Se *Tabell 1*). I studien injicerades hundarna i coxofemorala leden med AD-MSCs en gång, och kontrollerades sedan vid 30, 60 och 90 dagar. Hundarna hade haft OA i minst 6 mån, vägde olika mycket och var av varierande raser. För att inkluderas i studien, skulle försöksdjuren uppvisa symptom som ihållande hälla, begränsad rörlighet, stelhet och vid röntgen milda eller allvarligare degradativa förändringar i leden. Ingen NSAID-behandling, smärtlindring eller injektioner i leden fick ges till hundarna från och med 14 dagar innan studien påbörjades, och en total avhållsamhet krävdes under studien. Minst 23 g autologt fett samlades från varje hund i studien i både placebo - och försöksgruppen. I denna studie, där 18 hundar slutförde försöket, förbättrades hältan, rörligheten och smärtan hos försöksgruppen under de 90 dagar som studien pågick (Black *et al.*, 2007a).

2012 gjordes en mycket liten klinisk undersökning där behandling av kronisk humeroradial OA med autologa AD-MSCs gjordes (Se *Tabell 1*). Hundarna hade tidigare behandlats med antiinflammatoriska läkemedel utan resultat. Två hundar injicerades med MSCs med PRP (platelet-rich plasma) och de två andra med MSCs och hyaluronsyra (HA). Efter att en veterinär och djurägarna bedömt hältan både initialt i studien och en månad efter behandlingen hade en förbättring av hältan skett hos de fyra hundarna (Guercio *et al.*, 2012).

Vidare utfördes en dubbelblindad klinisk studie, där AD-MSCs enbart eller i kombination med plasma rich in growth factors (PRGF) användes som behandling i OA-drabbade hundar. Den kliniska effekten utvärderades med hjälp av tryckplattor som kunde känna av viktfördelningen vid rörelse. Studien visade att hundarnas hälla minskade under 3 månader för att efteråt återgå mot ursprungshältan (Se *Tabell 1*) (Vilar *et al.*, 2014).

I en annan kliniskt studie presenteras fördelarna med stamcellsbehandlingar framför behandling med NSAID vid OA i armbågsleden hos hund. Hundar av stora raser i åldern 5-11 år användes

i studien. Hundarnas gång bedömdes utifrån en skala från 0-6, där noll innebar frihet från hälta medan 6 innebar grav hälta/rörelsestörning. För att delta i studien skulle hundarna minst få en tvåa på skalan. 5 gram fettvävnad togs från försöksdjuren för isolering och multiplering *in vitro*. Den kliniska effekten bedömdes utifrån CT-bilder, ledrörlighet och muskulär atrofi, samt håltgraden som både veterinär och djurägare skattade. Vid den kliniska kontrollen dag 60 sågs en tydlig förbättring av håltan i NSAID-gruppen och en svag förbättring i AD-MSC gruppen. Vid dag 90 sågs en tydlig förbättring av håltan i AD-MSC gruppen, medan den var oförändrad i kontrollgruppen. Även halterna leukocyter, neutrofiler och mononukleära celler var oförändrade i kontrollgruppen vid dag 90 medan den stamcellsbehandlade gruppen hade lägre halter, vilket enligt författarna kan tyda på en immunsuppressiv effekt. Vid sista kontrollen dag 180 sågs inga symptom på hälta i AD-MSC gruppen, men en viss stelhet i lederna kunde ses. NSAID-gruppen hade istället fått en värre hälta än vid första kontrollen vid dag 0. CT-bilderna visade att både grupperna hade degradativa förändringar på leden, och inga förbättringar sågs vid dag 180 i varken AD-MSC gruppen eller kontrollgruppen. Andelen osteocyter förblev oförändrade i båda grupperna och inga biverkningar upptäcktes under studien. Denna studie var för liten för att kunna göra statistiska analyser, och ingen dubbelblindning gjordes (Nicolson *et al.*, 2014).

Följande kliniska studie jämförde behandling med AD-MSCs, PRGF och kombination av dessa två behandlingarna för OA i höften hos hundar (Se *Tabell 1*). Individer över 18 kg ingick i studien. Hundarna undersöktes vid 0, 1, 3 och 6 månader efter injektionen. En tydlig förbättring sågs vid funktionella begränsningar, ledrörlighet, rörelsevinklar, subjektiv smärtbedömning efter första månaden upptill 3:e till 6:e, och ingen skillnad upptäcktes mellan AD-MSC och AD-MSC + PRGF. PRGF gruppen hade dock sämre effekt än de två andra behandlingarna vid 6 månader (Serrato *et al.*, 2014).

I en klinisk studie injicerades AD-MSCs kombinerat med hyaluron i armbågsleder hos hundar med OA, för att sedan studera långtidseffekten av behandlingen (Se *Tabell 1*). I studien inkluderades 39 armbågar från 30 hundar som uppvisade tydlig hälta och hade diagnosen OA. Behandlingens kliniska effekt bedömdes utifrån en blankett om hundens hälta och gjordes vid 6, 9 och 12 månader. I denna studie samlades fettvävnaden från 13 friska hundar. Cellerna odlades i cellkulturer och gensekvenserades, och totalt 6 cellkulturer från 6 donatorer användes vidare. AT-MSCs differentierade till främst osteoblaster och adipocyter. Artroskopiska bilder efter behandlingen visade regnerade brosköar. Den nya vävnaden liknade hyalint brosk men innehöll mer fibrös bindväv än normalt. Morfologin var även annorlunda, och liknade mer meniskvävnaden från en frisk hund. Även högre halter av GAGs påvisades i de regenererade brosket. 31 av 39 armbågar behövde inget smärtstillande 1 år efter behandling och 3 andra fall fick en stabil förbättring av håltan, men smärtstillande behövdes ibland (Kriston-Pál *et al.*, 2017).

En nyare experimentell studie utvärderade den kliniska, samt histopatologiska effekten av platelet-rich plasma (PRP) och AD-MSC, både var för sig och i kombination som behandling av OA hos Beaglar mellan 2–3 års ålder. Hundarna behandlades med en injektion per vecka den första månaden av studien. Efter studiens slut avlivades hundarna och lederna undersöktes makroskopiskt samt mikroskopiskt. Resultat av behandlingen kontrollerades med hjälp av

Tabell 1: Översikt över studier om stamcellsbehandlingar hos hundar med OA

Publ.	Behandling	Antal ind.	Studiens längd (d)	Obeh. kontroll-grupp	Bedömning Objektiv (O) Subjektiv (S)	Kliniska resultat
Black <i>et al.</i> , 2007	1. PBS 2. AD-MSC	18	90	Ja	S	Hälta & smärta ↓ Rörlighet ↑
Guercio <i>et al.</i> , 2012	1. AD-MSCs + PRP 2. AD-MSCs+ HA	4	30	Nej	S	Hälta ↓
Vilar <i>et al.</i> , 2014	1. Obehandlad 2. AD-MSCs 3. AD-MSCs + PRGF	15	90	Ja	O	Hälta ↓ (↑)
Nicpoñ <i>et al.</i> , 2014	1. AD-MSCs 2. NSAID	12	180	Nej	S&O	Hälta ↓
Serrato <i>et al.</i> , 2014	1. AD-MSCs 2. AD-MSCs+ PRGF 3. PRGF	66	180	Nej	S	Led rörlighet ↑
Yun <i>et al.</i> , 2016	1. PBS 2. AD-MSCs 3. AD-MSCs+PRP 4. PRP	24	90	Ja	S&O	Hälta ↓ Inflammatoriska mediatorer ↓ GAGs och hyaluron ↑ Tryckbelastning ↓
Kriston-Pál <i>et al.</i> , 2017	1. AD-MSCs+ HA	30	360	Nej	S&O	Hälta ↓ Regenererade brosköar ↑ GAGs ↑

AD-MSCs: Fettderiverade mesenkymala stamceller, HA: Hyaluronsyra, GAGs: glukosaminoglykaner, NSAID: Icke steroida antiinflammatoriska medel, PBS: Fosfatbuffrad saltlösning, PRGF: Plasma rich in growth factor, PRP: Platelet rich plasma

realtids-PCR, histopatologi, ECM-komponenter, trycktålighet och genom objektiva bedömningar av hältan. I samtliga försöksgrupper minskade hältan och inflammatoriska mediatorer, medan tryckbelastningen förbättrades. Halten GAGs och hyaluron var mer gynnsam än i kontrollgruppen Både PRP- och AD-MSC-behandlingen visades sig ha gynnsamma effekter vid behandling av OA, se Tabell 1 (Yun *et al.*, 2016).

Studier på andra djurslag

Nedan följer ett urval av experimentella studier gjorda på andra djurslag än hund.

I en experimentell studie undersöktes långtidseffekten av allogena AD-MSCs-injektioner kombinerad med hyaluronsyra (HA) hos baggar med OA (se *Tabell 2*). Fåren blev injicerade vid 3 och 6 veckor efter att skador på brosket hade inducerats. Resultaten visade att intraartikulär AD-MSCs-behandling kan stoppa progressionen av OA och inducera broskregeneration i leden. AD-MSCs fanns även kvar i ledvätskan 14 veckor efter injektionen (Feng *et al.*, 2018).

En äldre experimentell studie som utfördes på kaniner, undersökte BM-MSCs adhesion och effekt vid injektion med hyaluronsyra (Se *Tabell 2*). OA inducerades kirurgiskt bilateralt i kaninernas knän, och efter 8 veckor behandlades de med BM-MSCs. Enbart hankaniner inkluderades i försöket, och alla avlivades antingen 3 eller 6 månader efter behandlingen för att kunna undersöka histologiska och immunohistokemiska förändringar i lederna (Grigolo *et al.*, 2009).

En senare studie från 2014 som gjordes på råttor undersökte effekten av BM-MSCs injektion med mono-jodacetat (MIA). Resultatet från studien blev att BM-MSC och MIA kunde reducera råttornas hälta men inga regenerativa broskförändringar kunde observeras. Se *Tabell 2* för ytterligare information (van Buul *et al.*, 2014).

2014 gjordes en omfattande studie om allogen MSCs behandling till OA, där kirurgiska skador i knäleder, kotleder, karleder och hovleder inducerades. Redan vid 6 veckor efter injektionen kunde 45% av de behandlade hästarna återgå till träning och 78% hade förbättrades ytterligare efter 18 veckor (Se *Tabell 2*) (Broeckx *et al.*, 2014).

Tabell 2: Översikt över ett urval experimentella studier kring stamcellsbehandling av OA på olika djurslag

Publ.	Djur- slag	Beh.	Antal ind.	Studiens längd	Obeh. Kontroll- grupp	Bedömning Objektiv (O) Subjektiv (S)	Resultat
Feng <i>et al.</i> , 2018	Får	1. PBS 2. AD- MSC+ HA (hög dos) 3. AD- MSCs+ HA (låg dos). 4. HA	28	98	Ja	O: Pato- histologisk	AD-MSC+HA: Typiskt ledbrosk Inflammatoriska mediatorer↓
Grigolo <i>et al.</i> , 2009	Kanin	1. Ingen behandling 2. BM- MSC+ HA 3. HA	62	180	Ja	O: Histologisk och immunohisto- kemiska förändringar i lederna	BM-MSC och HA: Hyalinlikt brosk↑ MSCs med och utan HA: MMPs ↓
van Buul <i>et al.</i> , 2014	Råttor	1. Ingen behandling 2. BM-MSC 3. BM-MSCs + MIA	24	28	Ja	O: Hälsa Histo- patologisk	Hälsa↓ Inga regenerativa brosk- förändringar
Broeckx <i>et al.</i> , 2014	Häst	1. Ingen behandlad 2. MSCs i knäleder, kotleder, karleder och hovleder	165	126	Ja	S: Hälsa	Hälsa↓

AD-MSCs: Fettderiverade mesenkymala stamceller, BM-MSCs: Benmärgsderiverade mesenkymala stamceller, HA: Hyaluronsyra, MIA: Mono-jodacetat, MMPs: Metalloproteinaser, PBS: Fosfatbuffrad saltlösning

DISKUSSION

Intraartikulär behandling av OA med mesenkymala stamceller har blivit en attraktiv behandlingsmetod inom veterinärmedicinen, på grund av deras potentiellt regenerativa förmåga och antiinflammatoriska egenskaper (Whitworth & Banks, 2014). Nyare forskning på hund har, enligt denna litteraturstudie, dessutom visat att stamcellsbehandlingen har en klinisk effekt i form av minskad hälta. Studierna har dock haft olika tillvägagångssätt, omfattat få antal djur och ibland saknat kontrollgrupper vilket bland annat försvårar bedömningen av terapins effekt.

Många studier på hund visar på en minskad hälta efter behandling med MSCs (Black *et al.*, 2007b; Guercio *et al.*, 2012; Serrato *et al.*, 2014; Vilar *et al.*, 2014; Yun *et al.*, 2016; Kriston-Pál *et al.*, 2017; Nicpoń *et al.*, 2014), men ofta bedöms det kliniska resultatet av stamcellsbehandlingen med hjälp av subjektiva bedömningar av hälta med utgångspunkt från olika smärtskalor. Det finns idag ingen "golden standard" för någon gemensam skala som bedömer hältan hos hundar med OA. Detta innebär att det är svårt att jämföra förbättringar eller försämringar av hältan mellan olika studier. Att framta en global skala för subjektiv bedömning av hälta vid OA, kan behövas. Dock kvarstår faktum att bedömningen trots allt är subjektiv och utförs av olika personer. Därför vore det fördelaktigt om fler studier i framtiden utnyttjade objektiva mätmetoder för att bedöma hältan.

Nyligen utvärderades subjektiva smärtskalors signifikans mot objektiv tryckplattemätning i en 6 månaders studie med MSCs-behandling av OA. Studien kom fram till att de subjektiva smärtskalorna inte gav en bra noggrannhet jämfört med en objektiv tryckplattemätning. Exempelvis visade de subjektiva smärtskalorna att hundarnas hälta minskat vid 6 månader efter studiens start, medan tryckplattorna visade att hundarna var lika halta igen som i början av studien (Vilar *et al.*, 2016).

Det senaste decenniet har flera kliniska än experimentella studier genomförts på hund. De flesta saknar dock obehandlade kontrollgrupper (Guercio *et al.*, 2012; Nicpoń *et al.*, 2014; Serrato *et al.*, 2014; Kriston-Pál *et al.*, 2017), vilket gör det svårt att utvärdera och dra någon slutsats av den kliniska effekten (Bakker *et al.*, 2013). Detta kan bero på att studierna gjorts på privatägda hundar, där det kan anses vara etiskt oförsvarbart att inkludera obehandlade grupper. Majoriteten av de studier som gjorts kring stamcellsbehandlingar av OA hos hund inkluderar generellt enbart ett fåtal individer, vilket innebär att statistisk signifikans inte kan uppnås. Det föreligger ett stort behov av flera studier på hund som inkluderar kontrollgrupper samt ett högre antal individer för att kunna utvärdera stamcellsbehandlingens effekt vid OA med större säkerhet.

Eftersom OA är en sjukdom som drabbar hela leden (Robinson *et al.*, 2016), borde även flera studier undersöka ledens olika komponenters påverkan av stamcellsterapin. Idag injiceras ofta stamcellerna in i ledhålan. Det är inte bevisat huruvida cellerna adhererar till brosket, och hur länge de sitter kvar. I två olika studier på får och kaniner har man dock visat histopatologiskt att hyalint brosk hade bildats efter behandling med HA och MSCs (Grigolo *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2018). I en annan undersökning på råttor fick man dock inga regenerativa broskförändringar efter behandling med MSCs och MIA, däremot sågs en minskad hälta (van Buul *et al.*, 2014). Flera experimentella studier som gjorts på olika djurslag i perioden 2003 -

2013 har haft problem med adhereringen till brosket. Ytterligare experimentella studier på hund där ledernas påverkan studeras histopatologiskt skulle behövas, för att bland annat kontrollera broskmatrixets uppbyggnad, och MSCs adherering samt differentiering i ledbrosket. Idag finns redan liknande studier hos andra djurslag, vilket ger en mer detaljerad bild över huruvida broskets eventuella behandlingsinducerade uppbyggnad har förbättrats av behandlingen.

Flera studier har däremot visat att MSCs kan ha antiinflammatoriska egenskaper (Whitworth & Banks, 2014), bland annat genom minskat antal inflammatoriska mediatorer, nedreglering av MMPs och normaliserade halter av GAGs och hyaluron i broskmatrixet (Grigolo *et al.*, 2009; Yun *et al.*, 2016; Feng *et al.*, 2018). Mer forskning om MSCs antiinflammatoriska egenskaper skulle ge en ännu klarare bild av behandlingen av OA:s lågradiga inflammation.

Mängden fettvävnad som samlas är mycket varierande mellan olika studier och halten mesenkymala stamceller som injiceras i ledhålan är oftast okänd. Enligt en humanmedicinsk studie innehåller enbart en liten andel av cellerna mesenkymala stamceller, som isoleras från fettvävnad (0,05%) eller benmärg (0,001 - 0,01%) (Kern *et al.*, 2006). Om detta även är överförbart till hund kan det innebära att dosen, om den inte mäts, varierar, och därför har stor påverkan på den kliniska effekten. Ett annat dilemma är att cellerna regenerativa förmåga även försämras med donatorns ökande ålder. De studier som presenterats i detta arbete har stora åldersspann mellan de deltagande individerna. Möjligtvis kan stamcellsterapin vara mer effektiv hos yngre individer, men studier på ämnet behövs (Whitworth & Banks, 2014). Av detta kan man dra slutsatsen att flera dos-responsstudier behövs, samt studier kring stamcellsterapin effekt hos hundar med OA i olika åldrar. Det finns också en svårighet i att bevisa ifall varje behandling med autologa celler ger samma effekt när stamcellerna samlas från individer från varierande raser och åldrar. Fler studier där genetiskt identiska stamceller används för att utvärdera cellernas kliniska effekt skulle behövas, för att kunna utvärdera den kliniska effekten utifrån samma utgångsmaterial.

Tidpunkten för injektionerna är oklara och varierar mycket mellan studier. Det är i dagsläget okänt vid vilket stadie av OA som behandlingen ger den mest optimala kliniska effekten. Även vävnadskällan till stamcellerna, vilken administrering som är effektivast, eller om autologa eller allogena celler ska användas är fortfarande oklart (Bakker *et al.*, 2013). I tillägg varierar källan till MSCs mellan studierna vilket också skulle kunna påverka resultatet. I de studier på hund som visats i detta arbete har AD-MSCs använts men i några av de experimentella studierna på andra djurslag har BM-MSCs injicerats istället.

I en artikel framhävs vikten av att flera studier kring stamcellsbehandlingarnas långtidsverkan genomförs, då det fortfarande finns flera informationsluckor kring detta (Nicpoń *et al.*, 2014). Det är inte heller klarlagt ifall flera stamcellsinjektioner kommer behövas för att bibehålla en förbättrad klinisk effekt och det är oklart hur länge behandlingen har klinisk effekt. I de studier som detta arbete tar upp, sträcker sig studierna sällan över en period längre än 6 månader. En studie på hund visade dock på en ihållande minskad håltä även ett år efter behandlingen (Kriston-Pál *et al.*, 2017).

Flera undersökningar har använt HA, MIA, PRP eller PRGF i kombination med MSCs. Detta medför att studierna blir problematiska att jämföra, och försvårar utvärderingen av

stamcellsterapins kliniska effekt. Grigolo *et al.* (2009) påpekar att exempelvis HA kan ge förbättrade broskreparationer, då det är en viktig komponent i broskmatrixet och att kombination av HA har i flera studier visats vara effektivt mot exempelvis hälta och möjligen broskreparation.

Konklusion

Utifrån denna litteraturstudie kan konkluderas att stamcellsbehandlingar på hund har visat kliniska förbättringar hos OA patienter i form av minskad hälta och antiinflammatoriska effekter. Även om MSCs verkar hämma progressionen av OA, åtminstone på kort sikt, behövs flera och längre studier som omfattar flera individer. Dessutom måste studierna innehålla obehandlade kontrollgrupper och resultaten utvärderas med objektiva mätmetoder för att få en klarare bild av behandlingen. Dos-responsstudier, studier kring MSCs adherering till brosket och vilka vävnadskällor till MSCs som är lämpligast, återstår att klarlägga i framtida forskning.

ORDLISTA

Förkortning	Engelska	Svenska
AD	Adipose derived	Fettvävnadsderiverad
BM	Bone marrow derived	Benmärgsderiverad
GAGs	Glucosaminoglykans	Glukosaminoglykaner
HA	Hyaluronic Acid	Hyaluronsyra
MIA	Monoiodoacetate	Mono-jodacetat
MMPs	Metalloproteinases	Metalloproteinaser
NSAID	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs	Icke steroida antiinflammatoriska medel
OA	Osteoarthritis	Osteoartrit
MSCs	Mesenchymal stem cells	Mesenkymala stamceller
PRP	Platelet Rich Plasma	
PRGF	Plasma Rich in Growth Factor	

LITTERATURFÖRTECKNING

- Bakker, E. de, Ryssen, B. V., Schauwer, C. D. & Meyer, E. (2013). Canine mesenchymal stem cells: state of the art, perspectives as therapy for dogs and as a model for man. *Veterinary Quarterly*, 33(4), pp 225–233.
- Black, L. L., Gaynor, J., Gahring, D., Adams, C., Aron, D., Harman, S., Gingerich, D. A. & Harman, R. (2007a). Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine*, 8(4), pp 272–284.
- Black, L. L., Gaynor, J., Gahring, D., Adams, C., Aron, D., Harman, S., Gingerich, D. A. & Harman, R. (2007b). Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: A randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Veterinary Therapeutics*, 8(4), pp 272–284.
- Broeckx, S., Suls, M., Beerts, C., Vandenberghe, A., Seys, B., Wuertz-Kozak, K. & Spaas, L. D. and J. H. *Allogenic Mesenchymal Stem Cells as a Treatment for Equine Degenerative Joint Disease: A Pilot Study*. Current Stem Cell Research & Therapy. Available from: <http://www.eurekaselect.com/124152/article>. [Accessed 2018-02-21].
- Buckwalter, J. A., Mankin, H. J. & Grodzinsky, A. J. (2005). Articular cartilage and osteoarthritis. *Instructional Course Lectures*, 54, pp 465–480.
- van Buul, G. M., Siebelt, M., Leijts, M. J. C., Bos, P. K., Waarsing, J. H., Kops, N., Weinans, H., Verhaar, J. A. N., Bernsen, M. R. & van Osch, G. J. V. M. (2014). Mesenchymal stem cells reduce pain but not degenerative changes in a mono-iodoacetate rat model of osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*, 32(9), pp 1167–1174.
- Cosenza, S., Ruiz, M., Toupet, K., Jorgensen, C. & Noël, D. (2017). Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis. *Scientific Reports*, 7(1), p 16214.
- Feng, C., Luo, X., He, N., Xia, H., Lv, X., Zhang, X., Li, D., Wang, F., He, J., Zhang, L., Lin, X., Lin, L., Yin, H., He, J., Wang, J., Cao, W., Wang, R., Zhou, G. & Wang, W. (2018). Efficacy and Persistence of Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Combined with Hyaluronic Acid in Osteoarthritis After Intra-articular Injection in a Sheep Model. *Tissue Engineering Part A*, 24(3–4), pp 219–233.
- Fortier, L. A. & Travis, A. J. (2011). Stem cells in veterinary medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, 2, p 9.
- Goldring, M. B. (2012). Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 4(4), pp 269–285.
- Grigolo, B., Lignigni, G., Desando, G., Cavallo, C., Marconi, E., Tschon, M., Giavaresi, G., Fini, M., Giardino, R. & Facchini, A. (2009). Osteoarthritis Treated with Mesenchymal Stem Cells on Hyaluronan-Based Scaffold in Rabbit. *Tissue Engineering Part C-Methods*, 15(4), pp 647–658.
- Guercio, A., Di Marco, P., Casella, S., Cannella, V., Russotto, L., Purpari, G., Di Bella, S. & Piccione, G. (2012). Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell Biology International*, 36(2), pp 189–194.
- Henrotin, Y., Sanchez, C. & Balligand, M. (2005). Pharmaceutical and nutraceutical management of canine osteoarthritis: Present and future perspectives. *The Veterinary Journal*, 170(1), pp 113–123.
- Johnston, S. A. (1997). Osteoarthritis. Joint anatomy, physiology, and pathobiology. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 27(4), pp 699–723.

- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H. & Bieback, K. (2006). Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *STEM CELLS*, 24(5), pp 1294–1301.
- Kriston-Pál, É., Czibula, Á., Gyuris, Z., Balka, G., Seregi, A., Sükösd, F., Süth, M., Kiss-Tóth, E., Haracska, L., Uher, F. & Monostori, É. (2017). Characterization and therapeutic application of canine adipose mesenchymal stem cells to treat elbow osteoarthritis. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*, 81(1), pp 73–78.
- Mamidi, M. K., Das, A. K., Zakaria, Z. & Bhonde, R. (2016). Mesenchymal stromal cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24(8), pp 1307–1316.
- Man, G. & Mologhianu, G. (2014). Osteoarthritis pathogenesis – a complex process that involves the entire joint. *Journal of Medicine and Life*, 7(1), pp 37–41.
- Nicpoń, J., Marycz, K., Grzesiak, J., Śmieszek, A. & Toker, N. Y. (2014). The advantages of autologous Adipose derived Mesenchymal Stem Cells (AdMSCs) over the NSAIDs application for degenerative elbow joint disease treatment in dogs - Twelve cases. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 20(3), pp 345–350.
- Robinson, W. H., Lepus, C. M., Wang, Q., Raghu, H., Mao, R., Lindstrom, T. M. & Sokolove, J. (2016). Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature reviews. Rheumatology*, 12(10), pp 580–592.
- Serrato, B. C., Zaragoza, M. R., Juncosa, J. S., Perez, J. D., Najera, D. L., Balletbo, M. G., Bertomeu, R. C. & Poveda, J. C. (2014). Regenerative therapy with mesenchymal stem cells from adipose tissue and plasma rich in growth factors in canine hip osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22, pp S428–S429 (Abstracts from the 2014 World Congress).
- Sjaastad, Ø. V., Sand, O., Hove, K. (2010). Bone tissue and mineral metabolism (Joints). *Physiology of domestic animals*. 2. ed, pp 268–269. Oslo: Scandinavian Veterinary Press. (2).
- Vaughan-Scott, T. & Taylor, J. H. (1997). The pathophysiology and medical management of canine osteoarthritis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 68(1), pp 21–25.
- Vilar, J. M., Batista, M., Morales, M., Santana, A., Cuervo, B., Rubio, M., Cugat, R., Sopena, J. & Carrillo, J. M. (2014). Assessment of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in osteoarthritic dogs using a double blinded force platform analysis. *BMC veterinary research*, 10, p 143.
- Vilar, J. M., Cuervo, B., Rubio, M., Sopena, J., Domínguez, J. M., Santana, A. & Carrillo, J. M. (2016). Effect of intraarticular inoculation of mesenchymal stem cells in dogs with hip osteoarthritis by means of objective force platform gait analysis: concordance with numeric subjective scoring scales. *BMC veterinary research*, 12(1), p 223.
- Whitworth, D. J. & Banks, T. A. (2014). Stem cell therapies for treating osteoarthritis: prescient or premature? *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 202(3), pp 416–424.
- Yun, S., Ku, S.-K. & Kwon, Y.-S. (2016). Adipose-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma synergistically ameliorate the surgical-induced osteoarthritis in Beagle dogs. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 11, p 9.
- Zachary, J. F. (2017). Degenerative joint disease. *Pathologic basis of veterinary disease*. 6. ed. St Louis: Elsevier.